

### Nouvelles IgG3 utiles pour stimuler la phagocytose

5 La présente invention se rapporte à l'utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3, produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies cancéreuses et infectieuses. Ces anticorps présentent une forte activité de  
10 phagocytose et peuvent être administrés pour traiter les cancers et les infections.

A ce jour, la grande majorité des anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés ou en cours d'essais cliniques appartiennent à la classe des IgG1. Cependant, en dehors des IgG1, d'autres sous-classes d'anticorps pourraient également  
15 présenter un intérêt pour le traitement de certaines pathologies.

Les IgG3 possèdent notamment des capacités effectrices particulières et jouent certainement un rôle important *in vivo*. Bien que ne représentant que 7% des IgG dans les plasma humains, leur proportion est augmentée au cours de certaines réponses  
20 immunitaires, par exemple après certaines infections virales (Basic and clinical aspects of IgG subclasses. Volume editor, F. Shakib. Basel; New York : Karger, 1986 (Monographs in Allergy; Vol 19. Pages 122-133), parasitaires (J Infect Dis. 2003 Mar 1;187(5):862-5, 2003. Immunoglobulin G (IgG) responses to Plasmodium falciparum glycosylphosphatidylinositols are short-lived and predominantly of the IgG3 subclass.  
25 Boutlis CS, Fagan PK, Gowda DC, Lagog M, Mgone CS, Bockarie MJ, Anstey NM) ou à la suite d'immunisations contre l'antigène Rh(D) (Iyer YS, Kulkarni SV, Gupte SC. Distribution of IgG subtypes in maternal anti-D sera and their prognostic value in Rh haemolytic disease of the new-born. Acta Haematol. 1992;88(2-3):78-81).

L'utilisation thérapeutique d'IgG3 reste jusqu'à présent très limitée. Elles sont utilisées en particulier dans le traitement préventif de la maladie hémolytique du nouveau-né, puisque d'une part, les anticorps polyclonaux anti-D actuellement utilisés sont constitués d'environ 20 à 30% d'IgG3 et d'autre part, des études cliniques utilisant un  
5 anticorps monoclonal anti-D IgG3 ont déjà été réalisées avec des résultats encourageants en terme de clairance d'hématies Rh positif (Clin Exp Immunol. 2003 Apr;132(1):81-6. Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is affected by the VF polymorphism of Fc gamma RIIIa (CD16). Kumpel BM, De Haas M, Koene HR, Van De Winkel JG, Goodrick MJ.)

10

Bien que le mécanisme d'action des anticorps polyclonaux anti-D conduisant à l'absence d'immunisation de la mère ne soit pas connu, de nombreuses études se sont attachées à démontrer les rôles respectifs des IgG1 et des IgG3 anti-D. Il a par exemple été montré que la formation de rosettes entre les cellules effectrices comme les  
15 monocytes, les lymphocytes T CD8, les lymphocytes B et les cellules NK avec des hématies Rhésus D positif, était plus rapide et plus importante avec des IgG3 anti-D en comparaison avec des IgG1. Ces différences peuvent s'expliquer par la plus longue région charnière (Hinge) des IgG3 par rapport aux IgG1. Cette structure favoriserait la formation de ponts entre les hématies chargées négativement et les cellules effectrices.  
20 (Vox Sang. 1989;56(2):101-3. Rate of interaction of IgG1 and IgG3 sensitized red cells with monocytes in the phagocytosis assay, Brojer E, Merry AH, Zupanska B; Immunology. 1992 Jul;76(3):446-51. The functional activity of Fc gamma RII and Fc gamma RIII on subsets of human lymphocytes. Hadley AG, Zupanska B, Kumpel BM, Leader KA).

25

L'existence d'une compétition entre des IgG1 et des IgG3 suggérant ainsi que ces deux sous-classes d'IgG pourraient reconnaître et activer le même récepteur Fc a été mentionnée dans d'autres études (Immunology. 1989 Apr;66(4):491-8. Distinctive role of IgG1 and IgG3 isotypes in Fc gamma R-mediated functions. Rozsnyay Z, Sarmay  
30 G, Walker M, Maslanka K, Valasek Z, Jefferis R, Gergely J).

Au cours d'infections parasitaires comme *Plasmodium falciparum*, ainsi qu'au cours des infections bactériennes, une réponse de type IgG3 est observée et elle est associée à la production d'IgG1 contre des antigènes protéiques. De même, dans le cas de la  
5 réponse anti-polysaccharidique d'origine bactérienne (anti-LPS), même si les IgG2 forment la sous-classe prédominante, il y a une forte réponse de type IgG1 et de façon plus limitée d'IgG3.

Pour les pathologies cancéreuses, il n'y a pas de données sur la production d'IgG3  
10 chez des patients, bien que des traitements anti-tumoraux utilisant des IgG3 couplées ou non à des cytokines aient été utilisés à titre expérimental (Kemminer SE, Conradt HS, Nimtz M, Sagi D, Peter-Katalinic J, Diekmann O, Drmic I, Muthing J Biotechnol Prog. 2001 Sep-Oct;17(5):809-21. Production and molecular characterization of clinical phase I anti-melanoma mouse IgG3 monoclonal antibody R24). (Peng LS,  
15 Penichet ML, Dela Cruz JS, Sampogna SL, Morrison SL. J Interferon Cytokine Res. 2001 Sep;21(9):709-20. Mechanism of antitumor activity of a single-chain interleukin-12 IgG3 antibody fusion protein (mscIL-12.her2.IgG3)).

La lignée YB2/0 a été sélectionnée depuis plusieurs années pour sa capacité à conférer  
20 aux IgG1 produites des propriétés fonctionnelles améliorées. Nous avons montré dans notre demande WO 01/77181 l'importance de sélectionner des lignées cellulaires permettant de produire des anticorps présentant une forte activité ADCC via le récepteur Fc $\gamma$ RIII (CD16). Nous avons trouvé que la modification de la glycosylation de la partie constante des anticorps produits dans des lignées de myélomes de rat telle  
25 que YB2/0 conduisait à améliorer l'activité ADCC.

Les structures glycaniques desdits anticorps sont de type biantennées, caractérisés par des chaînes courtes, une faible sialylation et une faible fucosylation.

Nous avons également découvert que le fait de présenter une forte interaction avec le CD16, a l'avantage d'induire également la production de cytokines, notamment la production d'IFN $\gamma$  et/ou autres cytokines ou chémokines.

- 5 Les deux caractéristiques précitées se complètent. En effet, la production d' IFN $\gamma$  ou autres cytokines et/ou chémokines par des cellules effectrices induite par les anticorps sélectionnés peut renforcer l'effet thérapeutique en stimulant des mécanismes effecteurs du système immunitaire autres que l'ADCC chez les patients traités. Le mécanisme d'action d'une telle stimulation tient probablement à une régulation positive
- 10 autocrine des cellules effectrices. On peut postuler que les anticorps se liant au CD16 induisent une activité cytotoxique ainsi que la production d'IFN $\gamma$  ou autres cytokines/chémokines qui au final conduit à augmenter encore davantage l'activité cytotoxique.
- 15 Dans le cadre de la présente invention, une IgG3 anti-D a été exprimée dans une lignée de myélome de rat afin d'évaluer si cette lignée, notamment YB2/0, peut conférer aux anticorps produits des propriétés fonctionnelles améliorées, comme c'est le cas pour les IgG1.
- 20 Nos résultats indiquent que les IgG3 ainsi produites présentent une capacité de fixation au CD16 comparable à celle des IgG1. Néanmoins, cette augmentation de fixation au CD16 n'est pas corrélée à une sécrétion de cytokines et induit une potentialisation de l'ADCC plus faible que celle qui est observée avec les IgG1. Cependant, dans certaines conditions «in vitro», c'est à dire en présence d'hématies fixées et
- 25 uniquement à forte concentration d'anticorps, les IgG3 produites dans YB2/0 apparaissent capables d'induire la sécrétion de cytokines. En revanche, nous avons observé de manière tout à fait inattendue que la phagocytose est augmentée.

## Description

Ainsi, dans un premier aspect, l'invention concerne des anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3 caractérisés en ce qu'ils sont produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat. De préférence, lesdites IgG3 sont produites dans la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0.

Dans de tels anticorps, la structure glycanique de la région Fc correspond à un type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation et une faible fucosylation.

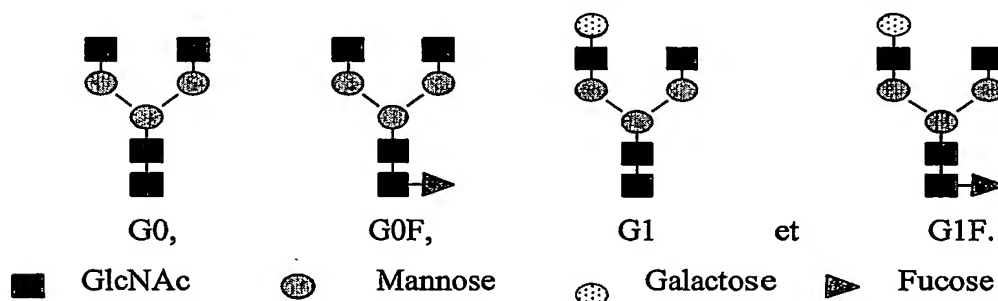
De plus, le taux de GlcNac intermédiaire est non nul.

De tels anticorps sont plus particulièrement sélectionnés parmi les formes :

15

20

25



Ainsi, l'invention porte sur des anticorps monoclonaux de classe IgG3 dans lesquels la teneur en fucose est inférieure à 65%, 60%, 50%, 40%, ou 35%. De préférence, la teneur en fucose est comprise entre 20% et 45% ou encore entre 25% et 40%. A titre d'exemple, la teneur en fucose est inférieure à 35%.

L'invention porte également sur des anticorps de classe IgG3 présentant le profil de glycosylation indiqué ci-dessus produits dans des systèmes biologiques équivalents, notamment dans des cellules, plantes ou animaux non humain génétiquement modifiés ou transformés, par exemple par introduction de séquence exprimant une ou plusieurs

glycosyl transférase(s) de sorte à obtenir des anticorps présentant un profil essentiellement similaire au profil de glycosylation obtenu chez YB 2/O.

Les IgG3 produites dans la lignée YB2/0 présentent par rapport à celles produites dans des lignées comme CHO par exemple, des caractéristiques fonctionnelles particulières :

a) une forte fixation au CD16 qui est comparable à celle des IgG1 produites dans la même lignée cellulaire.

b) une capacité à induire une inhibition de sécrétion de cytokines induite par les IgG1.

c) une capacité plus importante des IgG3 produits dans YB2/0 à induire la sécrétion d'IFN gamma, d'IL6 et de TNF alpha que les IgG3 produits dans CHO ; et une plus faible capacité des IgG3 YB2/0 à induire la sécrétion de TNF alpha et d'IFN gamma que les IgG1 YB2/0.

d) une potentialisation de la phagocytose.

L'anticorps de classe IgG3 de l'invention peut être sélectionné à titre d'exemple parmi les anticorps dirigés contre : CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11, CD18, CD19, CD20, CD25, CD45 et CD52 comme Campath-1H®, CD30, CD33, CD38 ou CD44.

D'autres anticorps peuvent être sélectionnés parmi les anti Ep-CAM, anti HER2, anti HER1, anti GD3, anti CA125, anti GD, anti GD2, anti CD-23 et anti ProteinC ; anti-KIR3DL2, anti-EGFR, des anti-idiotypes spécifiques d'inhibiteurs par exemple de facteurs de coagulation, les anti-viraux : HIV, HBV, HCV et RSV.

Dans un deuxième aspect, l'invention vise un procédé de production d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3 présentant les caractéristiques fonctionnelles mentionnées ci-dessus comprenant la transfection d'une lignée cellulaire de myélome de rat de préférence, la lignée YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0, avec un ou plusieurs vecteur(s) comprenant les séquences codantes pour les chaînes lourdes et légères d'anticorps de

classe IgG3, l'expression desdits anticorps dans la lignée cellulaire transfectée, l'extraction et la purification des anticorps.

De préférence, on utilise un système à deux vecteurs d'expression (par exemple des vecteurs dérivés du RSV), l'un codant pour les chaînes lourdes et l'autre codant pour les chaînes légères. Avantageusement, un marqueur de sélection différent est présent dans chaque vecteur. Des constructions spécifiques sont présentées à la figure 1. L'invention porte également sur le système décrit ci-dessus dans lequel les chaînes lourdes et légères sont produites en quantité équimolaire.

- 10 La construction de vecteurs d'expression peut être mise en œuvre selon les procédures connue de l'homme du métier (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Maniatis et al, Cold Spring Harbor).

- 15 La co-transfection dans la lignée de myélome de rat des deux vecteurs peut être réalisée au moyen de quantité équimolaire par les procédures standard du type précipitation au phosphate de calcium or par la lipofectine. Ensuite, les lignées transfectées sont sélectionnées dans les milieux de culture adéquats.

Bien entendu, d'autres stratégies, notamment l'utilisation d'un seul vecteur codant pour l'ensemble des chaînes de l'anticorps, peuvent être employées.

- 20 Dans un troisième aspect, l'invention concerne des lignées cellulaires de myélome de rat, notamment YB2/0 et des lignées dérivées, transfectées par un ou plusieurs vecteur(s) permettant l'expression d'une IgG3 fonctionnelle. L'invention porte également sur les cellules ayant été transfectées par un ou plusieurs vecteur(s) décrit(s) ci-dessus. Ces cellules sont caractérisées en ce qu'elles produisent des IgG3 présentant
- 25 le profil de glycosylation mentionné plus haut et au moins l'une des propriétés a) à d) décrites précédemment. Une cellule dérivée d'une lignée décrite plus haut est également objet de l'invention.

Dans un quatrième aspect, l'invention porte sur l'utilisation d'IgG3 décrites précédemment, notamment d'IgG3 exprimées dans YB2/0, pour la préparation d'un médicament.

- 5 Plus spécifiquement, l'invention vise l'utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3, produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment YB2/0 (ATCC N° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies cancéreuses, ou de différentes pathologies infectieuses
- 10 d'origines virales, bactériennes ou parasitaire infectieuses.

Dans un aspect particulier de l'invention, ces anticorps peuvent être utilisés pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention de l'alloimmunisation foeto-maternelle.

- 15 Préférentiellement, les patients concernés sont les patients faibles répondeurs au traitement avec une IgG1 ou une IgG3 exprimée dans CHO.

On entend par "patients faibles répondeurs", des patients traités ayant un état dit stable, avec moins de 50% de réduction et moins de 25% d'augmentation des lésions, et pas de nouvelles lésions. Ce groupe de patients comprend également les patients pour lesquels

20 aucune réponse n'est observée (progression de la maladie pouvant conduire à la mort). Pour les maladies infectieuses, ces patients correspondent à des patients pour lesquels la charge virale ou bactérienne est diminuée de moins de 50% par un traitement conventionnel.

- 25 De manière avantageuse, on peut utiliser l'anticorps chez les patients diagnostiqués tardivement.

Les pathologies cancéreuses pouvant être traitées de manière particulièrement avantageuse au moyen des anticorps selon l'invention sont choisies parmi le groupe

30 comprenant les tumeurs neuroectodermiques, les cancers colorectaux, les mélanomes,



le cancer du sein, les leucémies, en particulier la HCL (Hairy Cell Leukemia), les lymphomes tels que les DLBCL (Primary Diffuse Large B-Cell Lymphomas), les leucémies aigües, les ostéosarcomes, le cancer, notamment le cancer du poumon, cette liste n'étant pas exhaustive.

5

Dans un aspect particulier de l'invention, les pathologies cancéreuses traitées selon l'invention sont associées à des infections d'origine virale ou bactérienne, comme le cancer de la prostate (Lightfoot N, Conlon M, Kreiger N, Sass-Kortsak A, Purdham J, Darlington G. Medical history, sexual, and maturational factors and prostate cancer risk. *Ann Epidemiol.* 2004 Oct;14(9):655-662; Huycke MM, Gaskins HR. Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004 Jul;229(7):586-97), les leucémies, ou le sarcome de Kaposi. Les agents infectieux trouvés dans les maladies infectieuses associées au cancer peuvent être Candida, Achromobacter ou Alcaligenes (Aisenberg G, Rolston KV, Safdar A. Bacteremia caused by Achromobacter and Alcaligenes species in 46 patients with cancer (1989-2003). *Cancer.* 2004 Sep 23 ; Boktour MR, Kontoyiannis DP, Hanna HA, Hachem RY, Girgawy E, Bodey GP, Raad II. Multiple-species candidemia in patients with cancer. *Cancer.* 2004 Aug 31; ) ou encore le virus d'Epstein Barr.

10

15

20

Parmi les pathologies infectieuses avantageusement traitées avec l'anticorps selon l'invention, on peut citer la diphtérie, les fièvres hémorragiques virales, la fièvre typhoïde, la grippe, les hépatites B et C, les infections respiratoires dues au RSV, les infections au VIH et au CMV, la Légionellose, la Leishmaniose, la lèpre, la rage, le sida ou encore la tuberculose, cette liste n'étant pas limitative.

25

Les IgG3 de l'invention présentent à l'égard de ces utilisations un intérêt en raison de leur forte fixation sur le récepteur Fc de basse affinité (CD16) et/ou de leur capacité à induire une phagocytose.

Dans un aspect particulier de l'invention, le médicament selon l'invention est destiné à être utilisé en combinaison avec une IgG1. L'utilisation selon l'invention des IgG3 telles que décrites précédemment est particulièrement avantageuse dans cet aspect de l'invention pour la capacité de ces IgG3 à moduler négativement la sécrétion de cytokines induite par les IgG1, notamment les taux d'IFN gamma, de TNF alpha et/ou d'IL6.

Ainsi, dans un aspect particulier de l'invention, les IgG3 tels que décrits précédemment sont utilisées pour la préparation d'un médicament pour le traitement des pathologies cancéreuses chez les patients ayant un « cytokine release syndrome », notamment chez les patients traités par une IgG1 produite dans YB2/0. Cette application met à profit la capacité desdites IgG3 à moduler négativement la sécrétion de cytokines. Par exemple, on peut citer l'apparition d'hypothermie, de nécrose rénale aiguë et des maladies du foie dues au « cytokine release syndrome » induit par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD3, par exemple le 145-2C11 (Alegre ML et al, J Immunol. 1991 Feb 15;146 (4):1184-91; Chatenoud L. Anti-CD3 antibodies: towards clinical antigen-specific immunomodulation. Curr Opin Pharmacol. 2004 Aug;4(4):403-7; Yamada-Ohnishi Y, Azuma H, Urushibara N, Yamaguchi M, Fujihara M, Kobata T, Ikeda H. Cytotoxic Difference of T Cells Expanded with Anti-CD3 Monoclonal Antibody in the Presence and Absence of Anti-CD28 Monoclonal Antibody. Stem Cells Dev. 2004 Jun;13(3):315-22.).

Alternativement, l'invention vise l'utilisation d'une IgG3 décrite ci-dessus, qui peut être un anti-CD20, pour prévenir l'apparition du « cytokine-release syndrome » chez les patients traités avec le Rituximab® (IDEC-C2B8) ; Winkler U et al, Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody, Blood. 1999 Oct 1;94 (7):2217-24.

Alternativement, l'IgG3 de l'invention est utile pour prévenir les effets indésirables de l'anticorps CAMPATH® ou d'OKT3.

En effet, l'administration de CAMPATH 1-H, qui se lie au CD52 sur les lymphocytes et monocytes, induit la libération de TNF, d'IFN et d'IL-6 conduisant au « cytokine-release syndrome », Mark G. Wing et al, Mechanism of First-Dose Cytokine-Release Syndrome by CAMPATH 1-H: Involvement of CD16 (FcRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK Cells, J. Clin. Invest, Volume 98, Number 12, December 1996, 2819-2826. De même, OKT3, qui se lie au CD3 a également été décrit comme induisant le syndrome de sécrétion de cytokines (First MR, Schroeder TJ, Hariharan S. OKT3-induced cytokine-release syndrome: renal effects (cytokine nephropathy). Transplant Proc. 1993 Apr;25(2 Suppl 1):25-6).

Un autre objet de l'invention est de fournir un procédé pour moduler la sécrétion de cytokines induite par une IgG1 en ajoutant au système biologique contenant lesdites IgG1 des IgG3 produites dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment YB2/0.

L'association d'une IgG1 et d'une IgG3 est en effet d'un intérêt thérapeutique important puisqu'elle permet de diminuer les effets secondaires dus à l'IgG1 sans affecter significativement ses capacités cytotoxiques, et d'accroître l'effet thérapeutique via la phagocytose.

Dans un aspect particulier de l'invention, les IgG1 dont la sécrétion de cytokines est modulée sont produites dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment dans YB2/0.

Dans un dernier aspect, l'invention a pour objet une composition pharmaceutique d'anticorps thérapeutiques comprenant des IgG1, des IgG3 et au moins un excipient.

De manière avantageuse, l'une au moins de ces IgG (IgG1 ou IgG3) est produite dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment YB2/0.

## 5 Légendes et titres des figures

**Figure 1: Schéma des vecteurs d'expression**

**Figure 2 : Illustration des anticorps produits**

**Figure 3 : Interaction avec les cellules Jurkat CD16 des anticorps coatés sur les**  
10 **hématies fixées dans la plaque de microtitration.**

L'axe des x représente la fixation des anticorps sur les hématies et l'axe des y représente la fixation sur le CD16.

**Figure 4 : Fixation des IgG3 aux cellules Jurkat CD16 en absence de cibles.**

**Figure 5 : Sécrétion d'IL-2 induite par les IgG1 et les IgG3 exprimés dans YB2/0**  
15 **après interaction avec les cellules Jurkat CD16.**

**Figure 6 : Activité ADCC des anticorps anti-D IgG1 et IgG3 en présence de**  
**PBMC et d'immunoglobulines polyvalentes**

**Figure 7 : Activité ADCC en présence de cellules NK et d'anticorps anti-D IgG1**  
**et IgG3**

20 **Figure 8 : Sécrétion d'IL-2 par les cellules Jurkat CD16 induite par les IgG1 et**  
**IgG3 anti-Rhésus (hématies en suspension). Effet de l'ajout des différentes IgG3**  
**sur la sécrétion d'IL2l induite par les IgG1 YB2/0.**

**Figure 9 : Sécrétion de cytokines induites par les anticorps en présence de cellules**  
**NK ou de monocytes**

25 **Figure 10 : Pourcentage de cellules THP 1 ayant phagocytés une ou plusieurs**  
**hématies**

## Exemples

30 **Exemple 1 : Obtention de différents anticorps anti-D de classe IgG3.**

La construction des vecteurs d'expression pour produire deux anticorps recombinants est présentée à la figure 1. Après la construction de ces vecteurs d'expression, des transformants producteurs d'IgG3 D29 de spécificité anti-D ont été obtenus dans les lignées YB2/0 et CHO.

5

Les différents anticorps ainsi produits sont schématisés à la figure 2 :

- Anticorps 1: IgG3 D29 dans la lignée YB2/0, D29-YB2/0
- Anticorps 2: IgG3 exprimée dans la lignée CHO (lignée de référence pour la production industrielle de protéines recombinantes), D29-CHO.
- 10 - Anticorps 3: IgG3 (D29, produite par un lymphocyte B fusionné avec P3x229), D29-P3X229

**Exemple 2 : Etude de la fixation des trois anticorps de l'exemple 1 sur les cellules Jurkat CD16 (CFC).**

15

Ce test a été mis en place pour évaluer la capacité des anticorps anti-D à se fixer sur le récepteur CD16 (Fc gamma RIIIa) exprimé sur les cellules Jurkat CD16.

La première étape consiste à faire réagir l'anticorps anti-D avec les antigènes Rhésus exprimés à la surface de membranes d'hématies Rhésus positif préalablement coatées sur des plaques de 96 puits à fond rond (fixation par le Fab). Cette fixation est parallèlement détectée par un anticorps anti-IgG humaine marqué à la phosphatase alcaline.

25 La deuxième étape (après la fixation de l'anticorps sur son antigène), consiste à ajouter des cellules Jurkat CD16 qui vont pouvoir interagir avec la partie Fc des anticorps. Après centrifugation, un score (index de fixation de 1 à 3) correspondant aux cellules Jurkat CD16 qui se sont fixées sur les anticorps est estimé visuellement.

30 Les résultats sont présentés figure 3.

On peut conclure des résultats que l'expression d'une IgG3 dans la lignée cellulaire YB2/0 lui confère une meilleure capacité à se fixer sur les CD16 via son Fc, tandis que la même séquence exprimée dans la lignée CHO ou exprimée par le lymphocyte B fusionné (D29-P3X229) se fixe moins bien.

- 5 Par ailleurs, l'expression d'une IgG3 dans la lignée YB2/0 lui confère une capacité à se fixer sur CD16 qui est comparable à celle d'une IgG1 exprimée dans la même cellule (R297 exprimé dans YB2/0) et aussi comparable à celle d'une IgG3 purifiée à partir d'anticorps polyclonal anti-D.

10

**Exemple 3 : Mesure par compétition de la fixation des trois anticorps de l'exemple 1 sur les cellules Jurkat CD16 par cytométrie de flux.**

- Différentes dilutions des anticorps sont incubés en présence des cellules Jurkat CD16 et de l'anticorps anti-CD16 3G8 marqué PE. La réactivité des anticorps à évaluer avec CD16 est inversement proportionnelle à la fixation du 3G8 marqué PE qui reconnaît le site de fixation des IgG sur le récepteur Fc CD16. Ainsi, la fixation sur le CD16 des anticorps non marqués à évaluer va induire une diminution de la fixation de l'anticorps 3G8 marqué PE. Les données sont interprétées et les résultats finaux donnés en pourcentage de fixation sur CD16. La figure 4 que les anticorps IgG1 et IgG3 produits dans YB2/0 se fixent d'une façon comparable sur CD16 mais plus fortement que les anticorps IgG3 produits dans CHO ou par le lymphocyte B (D29-P3X229).

- Exemple 4 : Mesure de l'activation des cellules Jurkat CD16 (suite expérimentale de l'exemple 2).**

Après l'évaluation de la fixation des anticorps sur Jurkat CD16, les plaques sont ensuite incubées une nuit à 37°C, puis centrifugées. La quantité d'IL2 sécrétée par Jurkat CD16 dans les milieux de culture est évaluée par une technique ELISA.

30

Les résultats sont donnés en quantité d'IL2 en fonction de la fixation sur CD16 déterminée (exemple 2). La figure 5 montrent que l'interaction des IgG3 avec Jurkat CD16 induit une sécrétion d'IL2 beaucoup plus faible qu'en présence des IgG1. Ainsi l'IgG1 YB2/0 à l'opposé de l'IgG3 YB2/0 induit dès les premiers indices de fixation une sécrétion d'IL2 ; cependant, la courbe dose réponse obtenue avec les IgG3 est inférieure à celle obtenue avec les IgG1. Seule une forte interaction des IgG3 YB2/0 avec CD16 (indice de fixation maximal de 3) induit une sécrétion d'IL2 comparable à celle obtenue avec les IgG1 produites par YB2/0.

10

**Exemple 5 : Etude de la cytotoxicité induite par des anticorps anti-D contre des hématies Rh positif en présence de PBMC ou de cellules NK purifiées.**

Le test de cytolyse PBMC, quantifie la capacité des anticorps à lyser des hématies Rhésus positif en présence de cellules mononucléées humaines (PBMC) et d'immunoglobulines polyvalentes (Tégéline).

Les résultats sont présentés à la Figure 6.

L'activité cytolytique de l'IgG3 exprimée dans CHO, est comparable à celle obtenue avec l'anticorps exprimé par le lymphocyte B fusionné D29-P3X229.

Par contre, l'expression d'une IgG3 dans YB2/0 potentialise ses capacités à induire une lyse des hématies en présence de cellules mononucléées (PBL) par comparaison au même anticorps produit dans CHO ou par l'hétéromyélome.

Par rapport à l'activité de l'IgG3 produite dans CHO, l'augmentation de l'activité cytolytique de l'IgG3 exprimée dans YB20 est 2,8 fois plus importante et également comparable à celle induite par la fraction polyclonale IgG3 de WinRho.

Néanmoins, l'activité cytolytique des IgG3 produites dans YB2/0 est inférieure à celle des IgG1 produites dans YB2/0 et de l'anticorps polyclonal anti-D (Poly-D WinRho).

5 En présence de cellules NK purifiées (figure 7), l'IgG3 YB2/0 induit une lyse des hématies (55%) 5,5 fois plus importante que celle obtenue avec le même anticorps produit dans CHO (10%). L'anticorps produit par l'hétéromyélome P3X229 donne la valeur la plus faible (4%).

Néanmoins, l'activité cytolytique des IgG3 produites dans YB2/0 est inférieure à celle des IgG1 produites dans YB2/0 et de l'anticorps polyclonal WinRho.

10

**Exemple 6 : Mesure de sécrétion d'IL-2 par Jurkat CD16 après fixation des anticorps sur hématies en suspension..**

**Etude de l'inhibition de l'activation induite par les IgG1 YB2/0 par addition d'IgG3.**

15

Sécrétion d'IL2 : Les cellules Jurkat CD16 sont incubées avec des hématies Rhésus positif, l'IgG1 YB2/0 ou l'anticorps IgG3 D29 exprimés dans les différents systèmes d'expression (YB2/0, CHO, B-P3 X229). La sécrétion d'IL2 est mesurée dans les surnageants après une nuit d'incubation par technique ELISA.

20

Résultats :

Les IgG3 exprimées dans YB2/0 et CHO n'induisent pas de sécrétion d'IL2 contrairement aux IgG1 YB2/0, cela à concentration d'anticorps identique (figure 8). Nous pouvons en déduire que contrairement aux IgG1 exprimées dans YB2/0, la  
25 fixation sur le CD16 d'une IgG3 exprimée dans YB2/0 n'induit pas de sécrétion d'IL2 en présence d'hématies en solution et de cellules Jurkat CD16. Ainsi, l'exemple 4, dans lequel les hématies étaient coatées en microplaques, montrait que seule une forte interaction avec CD16 permettait d'induire une sécrétion d'IL2. L'utilisation de conditions plus physiologiques dans cet exemple, confirment le très faible potentiel des



IgG3 YB2/0 à induire une sécrétion d'IL2 à partir de Jurkat CD16, contrairement aux IgG1 YB2/0.

Etude d'inhibition : Les cellules Jurkat CD16 sont incubées avec des hématies Rhésus positif et un mélange IgG1 YB2/0 avec les différentes IgG3 D29 exprimées dans les différents systèmes d'expression (YB2/0, CHO, B-P3 X229). La sécrétion d'IL2 est mesurée dans les surnageants après une nuit d'incubation par technique ELISA.

Résultats :

Les IgG3 produites dans CHO et P3X229 n'ont pas d'effet sur la sécrétion d'IL2 induite par l'IgG1 YB2/0. Par contre, l'IgG3 produite dans YB2/0 induit une diminution de l'induction d'IL2 (figure 8).

L'expression d'une IgG3 dans YB2/0 induit donc une modulation négative de l'activité activatrice des IgG1.

#### **Exemple 7 : Induction de la sécrétion de cytokines par les anticorps anti-D.**

Les cellules NK ou les monocytes sont incubés avec des hématies Rhésus positif, l'IgG1 YB2/0 ou l'anticorps IgG3 D29 exprimés dans YB2/0 ou CHO. La sécrétion de différentes cytokines (IL1 bêta, IL6, IFN gamma, TNF alpha) est mesurée dans les surnageants après une nuit d'incubation par technique ELISA.

Les résultats sont présentés sur la figure 9. En présence de cellules NK, les taux d'IL1 bêta et d'IL6 sont comparables pour tous les anticorps. Par contre, les taux de TNF alpha et d'IFN gamma produits par les cellules NK en présence de l'IgG3 exprimée par YB2/0 sont inférieurs à ceux induits par l'IgG1 exprimée dans YB2/0 (figure 9). Néanmoins, cette sécrétion est supérieure à celle observée avec l'IgG3 produite par CHO.

En présence de monocytes, les taux d'IL1 bêta et d'IFN gamma (nuls) sont identiques pour tous les anticorps. Les taux d'IL6 produits par les monocytes sont comparables pour les IgG1 et IgG3 produites dans YB2/0 mais inférieurs pour l'IgG3 produite dans

CHO. Pour le TNF alpha, on observe une légère baisse en présence de l'IgG3 produite par CHO.

**Exemple 8 : Capacité des IgG3 anti-D à induire une phagocytose d'hématies Rhésus positif par les cellules THP-1.**

Test de phagocytose : les cellules THP-1 sont incubées en présence d'hématies Rhésus positif et d'anticorps. Le nombre de cellules ayant phagocyté au moins une hématie est évalué par comptage au microscope. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules ayant phagocyté au moins une hématie (voir figure 10).

Les IgG de l'anticorps polyclonal anti-D WinRho ont la capacité (43.4%) la plus forte à induire la phagocytose des hématies Rhésus positif par la cellule THP-1. L'IgG1 YB2/0 est peu active (14.6%). Au niveau des IgG3, l'IgG3 YB2/0 induit une phagocytose de 34.5%, supérieure aux IgG3 polyclonales purifiées (IgG3 WinRho). Les plus faibles activités de phagocytose sont obtenues avec les IgG3 produites par le lymphocyte B fusionné (D29 P3 X229) et l'IgG3 produite dans CHO.

On peut conclure que l'expression d'une IgG3 dans YB2/0 potentialise ses capacités à induire la phagocytose, cette propriété pouvant être particulièrement intéressante dans les maladies infectieuses ainsi que dans la maladie d'Alzheimer (McGeer PL, McGeer E. Immunotherapy for Alzheimer's disease. Sci Aging Knowledge Environ. 2004 Jul 07;2004) et ceci en comparaison avec une IgG3 exprimée dans CHO ou sécrétée par un hétéromyélome.

**Conclusion**

Les profil glycanique particulier de l'IgG3 produite dans YB2/0, c'est à dire, des formes courtes, non sialylées, et avec un taux de fucose inférieur à 35% lui confère des propriétés originales comme démontrées ci-dessus :

- une forte fixation au CD16 qui est comparable à celle des IgG1,

- une potentialisation de la phagocytose
  - une augmentation de l'activité ADCC en présence de PBMC ou cellules NK par rapport aux IgG3 produites dans CHO.
  - une capacité à entrer en compétition avec les IgG1 au niveau de leur fixation au
- 5 les CD16 et ainsi moduler négativement la sécrétion de cytokines.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains de classe IgG3, produits dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment YB2/0 (ATCC n° CRL 1662) ou une lignée dérivée ou modifiée de YB2/0, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de différentes pathologies cancéreuses ou infectieuses.
- 10 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a lieu chez les patients faibles répondeurs au traitement avec une IgG1 ou une IgG3 exprimée dans CHO.
- 15 3. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle a lieu chez les patients diagnostiqués tardivement.
- 20 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que lesdites pathologies cancéreuses sont choisies parmi le groupe comprenant les tumeurs neuroectodermiques, les cancers colorectaux, les mélanomes, le cancer du sein, les leucémies, en particulier la HCL (Hairy Cell Leukemia), les lymphomes tels que les DLBCL (Primary Diffuse Large B-Cell Lymphomas), les leucémies aiguës, les ostéosarcomes.
- 25 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que lesdites pathologies cancéreuses sont associées à des infections d'origine virale ou bactérienne.
- 30 6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que lesdites infections d'origine virale ou bactérienne sont choisies parmi le groupe comprenant le cancer de la prostate, les leucémies et le sarcome de Kaposi.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdites pathologies infectieuses sont choisies parmi le groupe comprenant la diphtérie, les fièvres hémorragiques virales, la fièvre typhoïde, la grippe, les hépatites B et C, les infections respiratoires dues au RSV, les infections au VIH, la Légionellose, la Leishmaniose, la lèpre, la rage, le sida ou la tuberculose.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la capacité dudit anticorps à induire une phagocytose.
9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être utilisé en combinaison avec une IgG1.
10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la capacité dudit anticorps à moduler négativement la sécrétion de cytokines induite par les IgG1, notamment les taux d'IFN gamma, de TNF alpha et/ou d'IL6.
11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, pour la préparation d'un médicament pour le traitement des pathologies cancéreuses chez les patients ayant un « cytokine release syndrome ».
12. Utilisation selon la revendication 11, pour la préparation d'un médicament pour traiter les patients atteints d'hypothermie, de nécrose rénale aiguë ou des maladies du foie dues au « cytokine release syndrome ».
13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que ledit « cytokine release syndrome » a été induit par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CD3.

14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisée en ce que ledit anticorps de classe IgG3 est un anti-CD20, pour prévenir l'apparition du « cytokine-release syndrome » chez les patients traités avec le Rituximab® (IDEC-C2B8).

5

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12 pour prévenir les effets indésirables de l'anticorps CAMPATH® ou d'OKT3.

16. Procédé pour moduler la sécrétion de cytokines induite par une IgG1 caractérisé en ce qu'on ajoute au système biologique contenant lesdites IgG1 des IgG3 produites dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment YB2/0.

10

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que lesdites IgG1 sont produites dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment dans YB2/0.

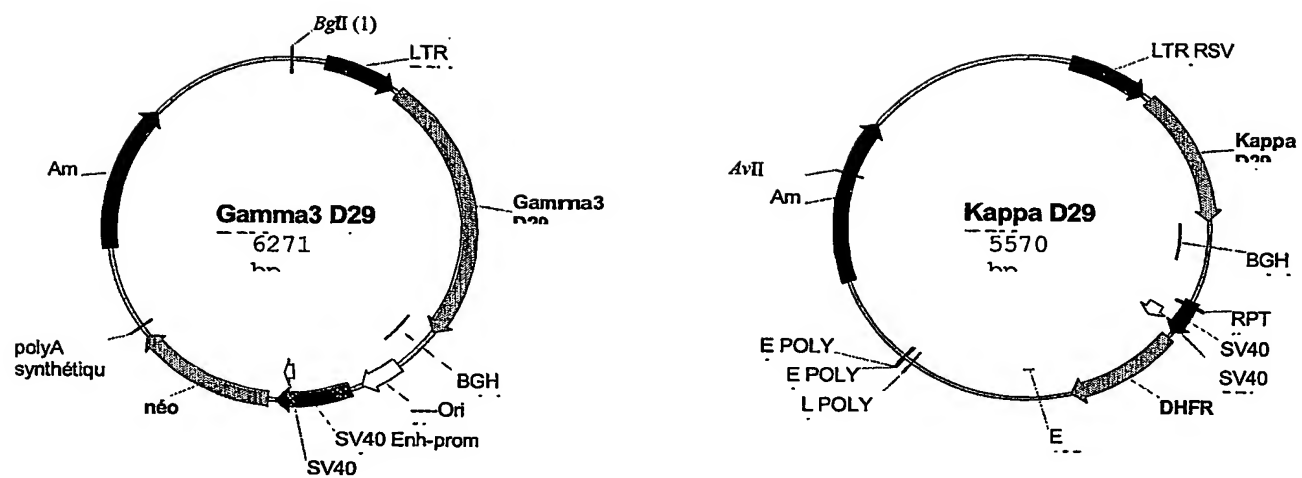
15

18. Composition pharmaceutique d'anticorps thérapeutiques comprenant des IgG1, des IgG3 et au moins un excipient.

19. Composition selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'une au moins desdites IgG est produite dans une lignée cellulaire de myélome de rat, notamment YB2/0.

20

1 / 7

**Figure 1**

2 / 7

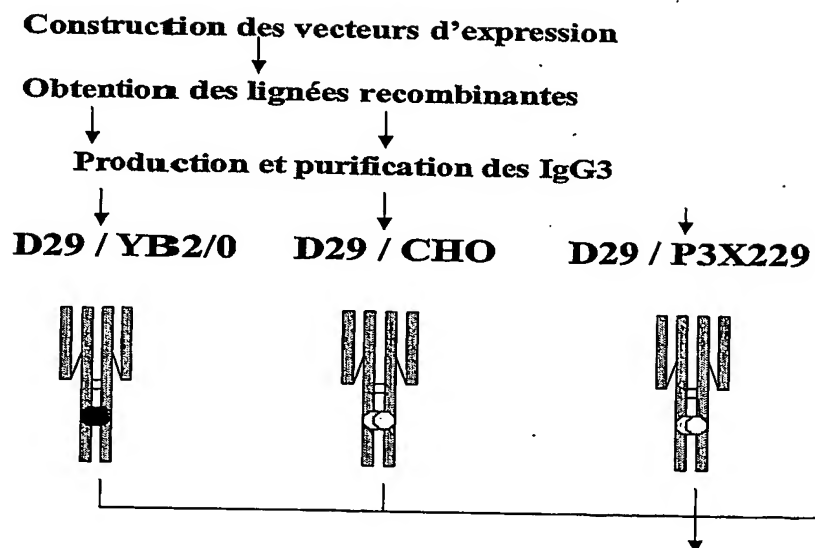


Figure 2



3 / 7

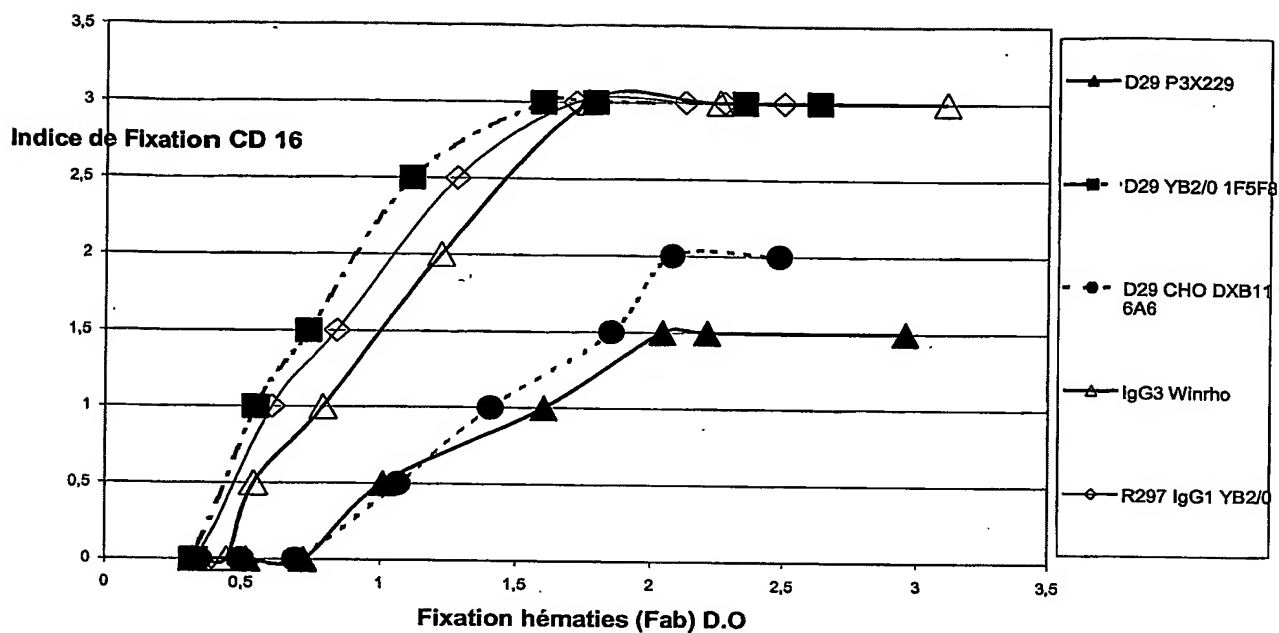


Figure 3

% de fixation au CD16. 100% = 3G8 anti-CD16

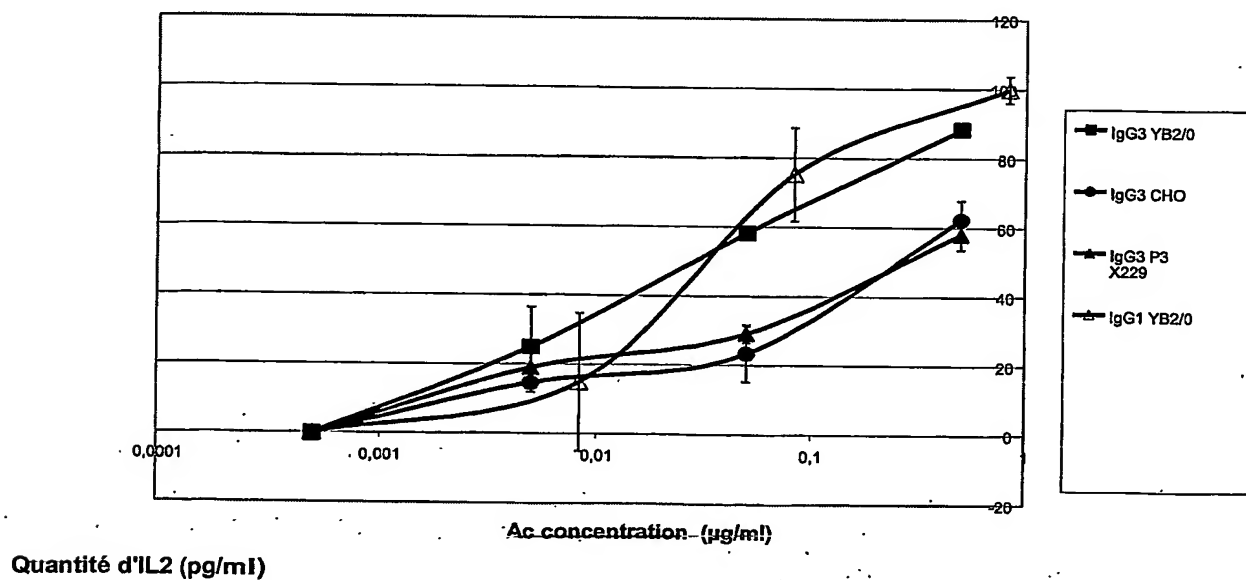


Figure 4

4 / 7

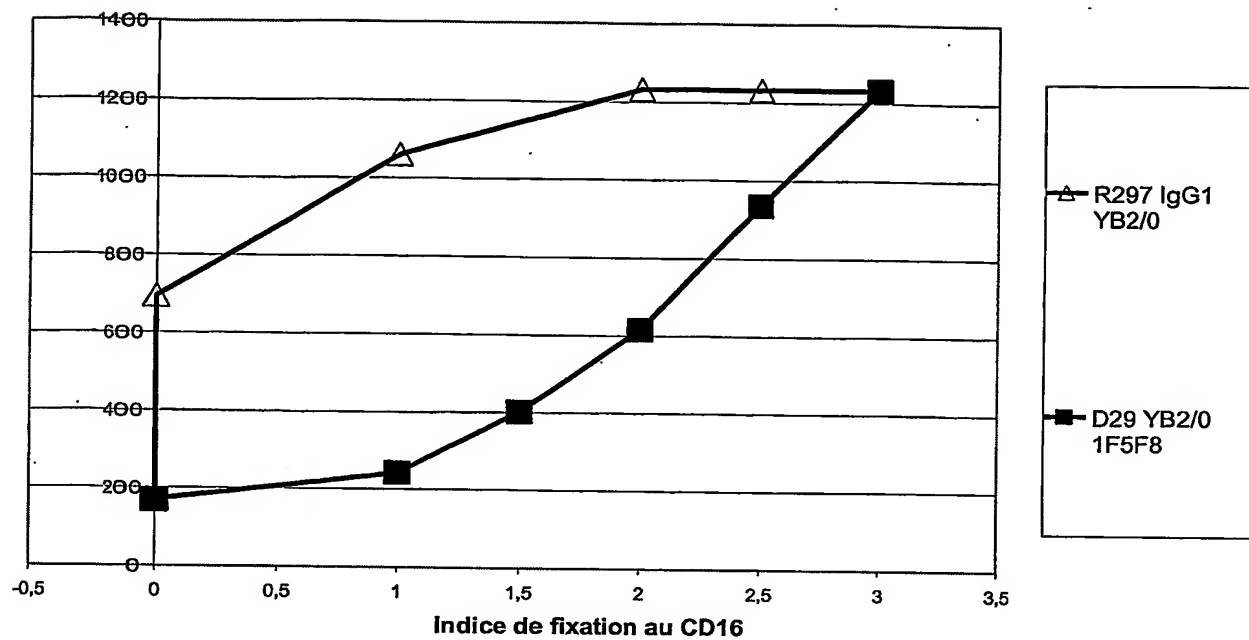


Figure 5

5 / 7

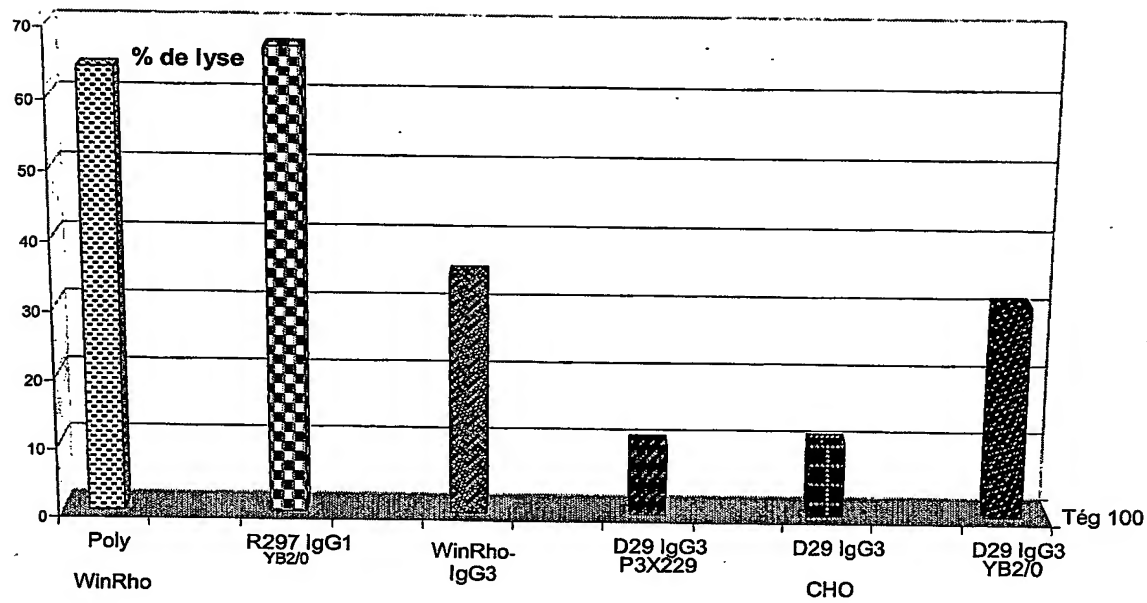


Figure 6

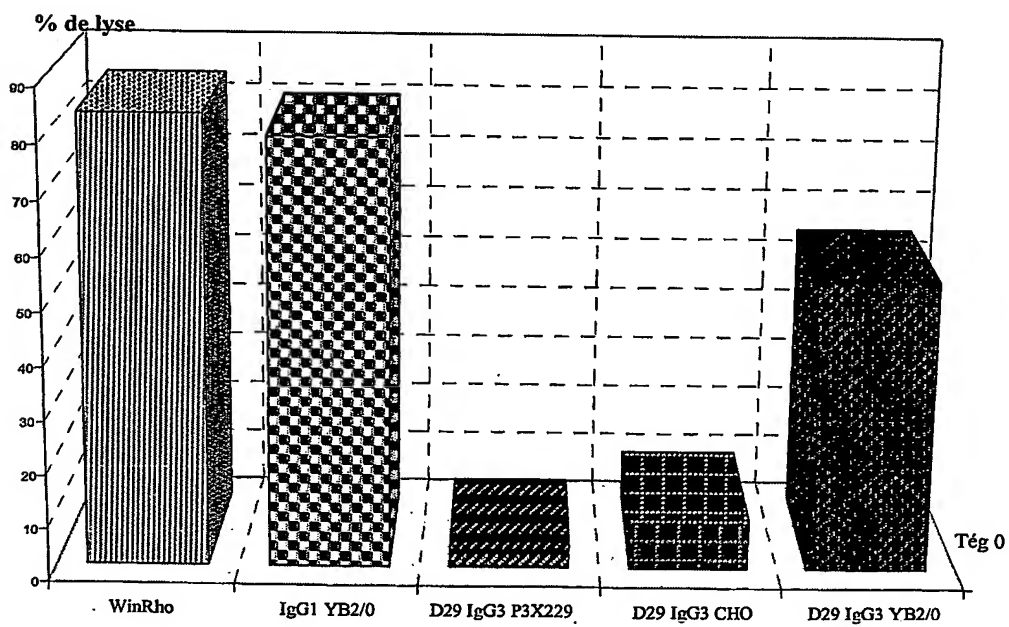


Figure 7

6/7

# Activation de Jurkat CD16 par les IgG1 et IgG3 anti-Rhésus (hématies en suspension).

Effet de l'addition d'IgG3 sur l'activation induite par les IgG1 YB2/0

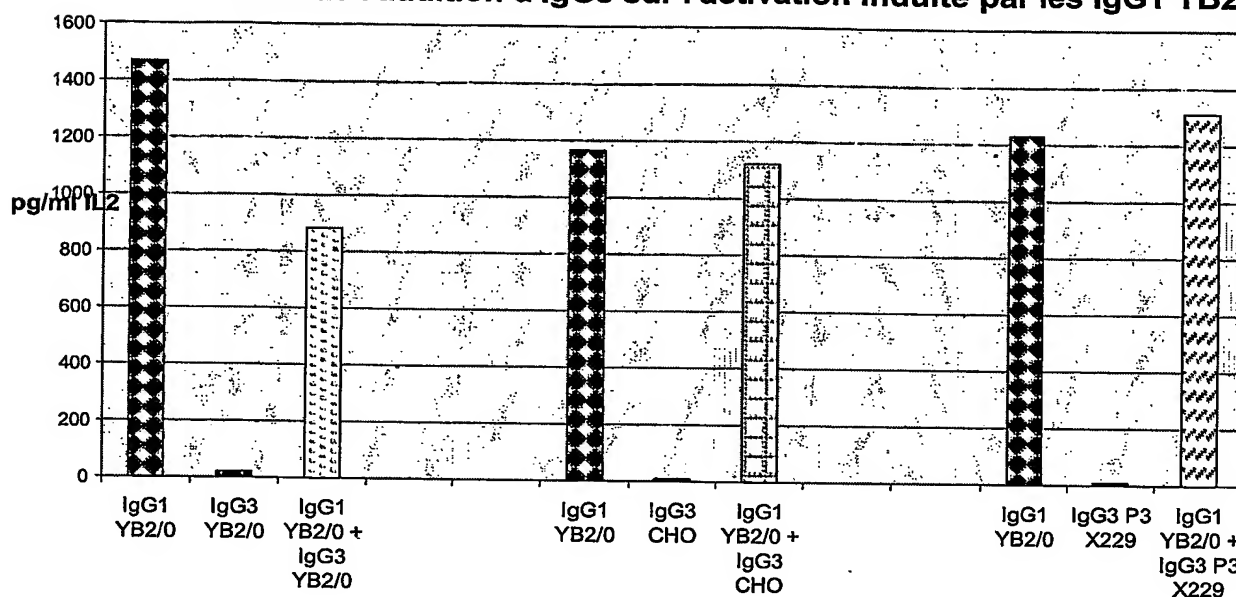


Figure 8

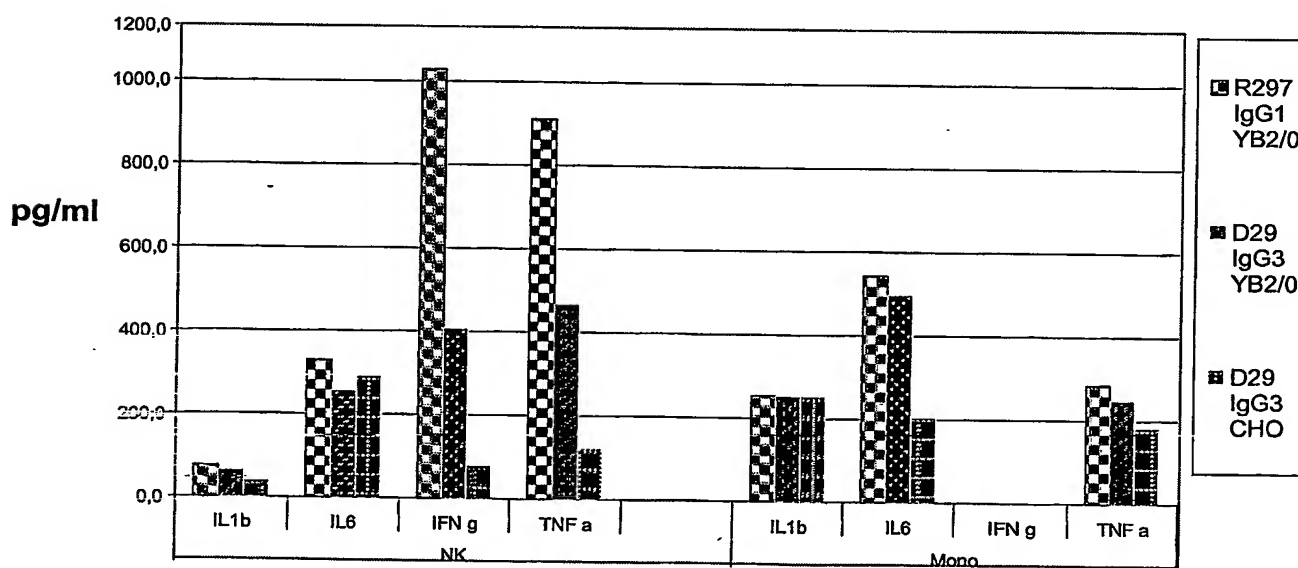


Figure 9

7/7

Pourcentage de  
Phagocytose (THP-1)

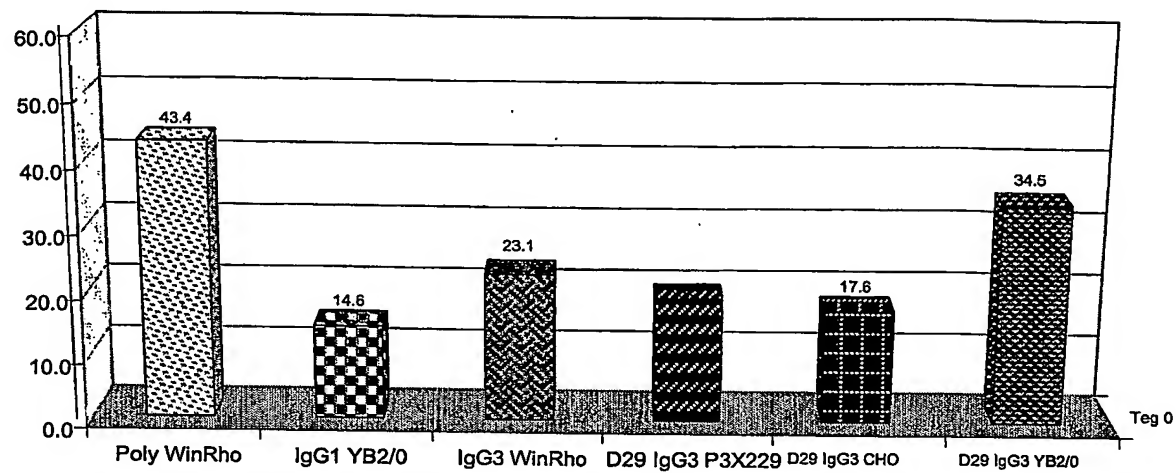


Figure 10